昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，June 2007，50(6)：597 – 603 ISSN 0454-6296

不同地理种群美洲斑潜蝇及近缘种的 rDNA-ITS1 序列分析和比较

王莉萍[1,2]，杜予州[2,*]，何娅婷[2]，陆亚娟[3]，陆自强[2]

(1. 中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100094；
2. 扬州大学应用昆虫研究所，扬州 225009；3. 扬州进出境检验检疫局，扬州 225009)

摘要：【目的】通过对美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae* Blanchard 不同地理种群及近缘种间的核糖体 DNA 第一内转录间隔区(rDNA-ITS1)进行比较，分析美洲斑潜蝇不同地理种群间的遗传分化情况，并为美洲斑潜蝇与近缘种间提供分子鉴别标记。【方法】用 PCR 产物直接测序法及克隆测序法对我国美洲斑潜蝇 8 个地理种群的 rDNA-ITS1 序列进行测序，并调用 GenBank 中 3 个近缘种的 rDNA-ITS 序列，运用软件 MEGA3.1 对美洲斑潜蝇不同地理种群及近缘种间的 rDNA-ITS1 序列进行分析。【结果】美洲斑潜蝇 8 个地理种群间的分化程度较低，只有 8 个变异位点，遗传距离都在 0.02 以下，但 4 个近缘种间的碱基差异显著，遗传距离为 0.149 ~ 0.390，有 126 个变异位点，12 个美洲斑潜蝇特异性识别位点。【结论】虽然基于 rDNA-ITS1 序列所显示的美洲斑潜蝇各地理种群之间的遗传分化很小，但是其分化趋势与地理分布基本相吻合；得到的 12 个特异性识别位点不仅可以作为美洲斑潜蝇与其近缘种间鉴别的分子标记，而且可为今后设计鉴别性 PCR 引物提供重要的参考依据。

关键词：美洲斑潜蝇；地理种群；近缘种；rDNA-ITS1；遗传分化

中图分类号：Q969 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2007)06-0597-07

Sequence analysis and comparison of rDNA-ITS1 of geographical populations of *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) from China and closely related species

WANG Li-Ping[1,2], DU Yu-Zhou[2,*], HE Ya-Ting[2], LU Ya-Juan[3], LU Zi-Qiang[2] (1. State Key Laboratory for Biology of Plant Disease and Insect Pests, Institute of Plant Protection Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100094, China; 2. Institute of Applied Entomology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 3. Yangzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yangzhou 225009, China)

Abstract:【Aim】To analyze the genetic differentiation of rDNA-ITS1 sequences among the geographical populations of *Liriomyza sativae* Blanchard and to provide molecular markers for identifying *L. sativae* against its closely related species.【Method】rDNA-ITS1 regions of eight geographical populations of *L. sativae* from China were sequenced by using PCR product sequencing method or clone sequencing method, and rDNA-ITS1 sequences of three closely related species (*L. trifolii*, *L. huidobrensis*, and *L. bryoniae*) were retrieved from GenBank. The rDNA-ITS1 sequences among populations of *L. sativae* and their closely related species were analyzed using MEGA3.1.【Results】The ITS1 difference among the geographical populations of *L. sativae* was very low, with only 8 variable sites for *L. sativae* and genetic distance below 0.02. But the difference of the ITS1 sequences among *L. sativae* and its closely related species was significant, with 126 variable sites, 12 authenticable sites for *L. sativae* and genetic distance between 0.149 – 0.390.【Conclusion】Despite of the low diversity, the trends of differentiation of geographical populations of *L. sativae* were consistent with the geographical distribution. The characteristics of rDNA ITS sequence can be

基金项目：国家自然科学基金项目(30370932)；植物病虫害生物学国家重点实验室开放基金项目；"973"项目(2006CB102002)；江苏科技攻关项目(BE2001343)

作者简介：王莉萍，女，1980 年 4 月生，江苏连云港人，博士研究生，主要从事外来有害生物的研究，E-mail：wlp.alice@tom.com
* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.：0514-7971854；E-mail：yzdu@yzu.edu.cn

收稿日期 Received：2006-11-17；接受日期 Accepted：2007-04-11

used as good markers for authenticating *L. sativae* populations form their closely related species.

Key words: *Liriomyza sativae*; geographical populations; closely related species; rDNA-ITS1; genetic differentiation

美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae* Blanchard 隶属于双翅目(Diptera)、潜蝇科(Agromyzidae)、植潜蝇亚科(Phytomyzinae)。美洲斑潜蝇具有繁殖力强,发育周期短,寄主范围广等特点,故可在较短的时间爆发成灾,许多国家将其列为重要的检疫性害虫(Deeming,1992)。自1993年底在海南发现该虫以来(康乐,1996),经过几年的调查发现,我国29个省、自治区和直辖市已有该虫的分布,并对瓜果蔬菜、烟草、棉花等经济作物和花卉造成严重危害,已成为我国农业生产上的一个突出问题(王军等,1999;陈兵等,2002;雷仲仁和王音,2005)。因此,迫切需要对美洲斑潜蝇不同地理种群进行比较研究,特别是对不同地理种群群体遗传结构多态性特征、遗传分化与生物入侵的关系的研究,才能揭示其入侵过程中种群系统发育地理格局与演变机制,为制定美洲斑潜蝇的防治策略提供理论依据。

用于种下遗传分化研究和种类分子鉴定的技术有很多,新的方法也在不断的出现,国内外已有报道应用RAPD-PCR、PCR、RFLP-PCR等分子生物学技术对斑潜蝇的一些种类进行过种下遗传分化和近缘种的鉴定研究(邱一中等,2000;Morgan *et al*.,2000;Scheffer *et al*.,2001;Scheffer and Lewis,2001)。分子标记多种多样,关键是选择符合研究目的的标记类型。核糖体DNA中的内转录间隔区(rDNA ITS区)序列的进化速率较快,可以提供较丰富的变异位点和信息位点。经初步统计,到2000年底人们已对无脊椎动物中的6个门,62个属的动物的ITS1和ITS2做过研究(唐伯平等,2002)。因此,本研究对我国美洲斑潜蝇几个地理种群rDNA-ITS1进行测序,并从GenBank中调出几个与美洲斑潜蝇同属的近缘种序列,分析不同斑潜蝇种间及美洲斑潜蝇地理种群之间ITS1序列的遗传分歧和相似性,以揭示美洲斑潜蝇的来源及其在全国迁移扩散的规律,并为美洲斑潜蝇的快速鉴别提供分子标记。

1 材料与方法

1.1 供试样品

实验所用美洲斑潜蝇为2005年6月–9月间采自陕西、安徽、江苏、贵州、广东、海南等省的露地蔬菜上,并在实验室内用同一寄主四季豆饲养至少3代以上。成虫羽化后,将活虫分装于消过毒的微量离心管中,加入无水乙醇,迅速置–70℃冰箱保存待用。每个种群只测试1个个体。

表1 美洲斑潜蝇种群和近缘种的采集信息及rDNA-ITS1序列的GenBank登录号

Table 1 Collection data and GenBank accession numbers of rDNA-ITS1 sequences of the populations of *Liriomyza sativae* and their closely related species

种名 Species	采集地点 Sampling location	代号 Code	寄主植物 Host plant	采集时间 Sampling date	GenBank 登录号 GenBank accession no.
美洲斑潜蝇 *L. sativae*					
	北京 Beijing	BJ	豇豆 Cowpea	2005/6	DQ925845
	陕西西安 Xi'an, Shaanxi	SXXA	豇豆 Cowpea	2005/9	DQ925844
	安徽阜阳 Fuyang, Anhui	AHFY	丝瓜 Towel gourd	2005/6	DQ925846
	江苏沭阳 Shuyang, Jiangsu	JSSY	四季豆 Kidney bean	2005/9	DQ925848
	海南儋州 Danzhou, Hainan	HNDZ	丝瓜 Towel gourd	2005/8	DQ925849
	贵州铜仁 Tongren, Guizhou	GZTR	番茄 Tomato	2005/8	DQ999081
	广东广州 Guangzhou, Guangdong	GDGZ	番茄 Tomato	2005/7	DQ999082, DQ925847
	广西南宁 Nanning, Guangxi	GXNN	番茄 Tomato	2005/8	DQ925845
三叶草斑潜蝇 *L. trifolii*	–	*L. tri*	多花菜豆 *Phaseolus coccineus*	–	AY323210
南美斑潜蝇 *L. huidobrensis*	–	*L. hui*	矮牵牛 *Petunia hybrida*	–	AY323208
番茄斑潜蝇 *L. bryoniae*	–	*L. bry*	豌豆 *Pisum sativum*	–	AY323211

1.2 总DNA提取

DNA提取按照温硕洋和何晓芳(2003)的痕量DNA模板制备方法,并稍作改动。具体步骤如下:取美洲斑潜蝇成虫(用无水乙醇浸泡过)1头,用TE(pH 8.0)浸泡1~2 h,以回软组织和去除其他化学物质对PCR的影响。待吸干水份后,将样品放入

0.2 mL 离心管中，加入 10 μL 的研磨缓冲液（50 mmol/L NaCl，10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0，1 mmol/L EDTA，200 μg/mL 蛋白酶 K），用烧融后的枪头将样品彻底研磨，用 30 μL 研磨缓冲液清洗枪头，研磨液在 56℃恒温器中消化 1～2 h，消化后的产物在 95℃保温 1 min，使蛋白酶 K 变性，2 000～3 000 r/min 离心 30 s 沉淀残渣，上清液作为做 PCR 的模板或保存在 －20℃冰箱中备用。

1.3　PCR 扩增

扩增的目的片段为 rDNA 内转录间隔区 Ⅰ（ITS1）中的一段序列，用于扩增的引物参照温硕洋和何晓芳（2003）的 18SF（5′-GAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3′）和 5.8SR（5′-GTCCTGCA-GTTCACACGATG-3′），引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

PCR 反应体系（25 μL）包括以下试剂：10 × buffer（不含 Mg^{2+}）2.5 μL，dNTPs（2.5 mmol/L）2 μL，正反引物（10 mmol/L）各 1.0 μL，Taq 酶 0.3 μL（5 U/μL），Mg^{2+}（25 mmol/L）1.5 μL，模板 DNA 1.0 μL，加灭菌双蒸水至 25 μL。PCR 步骤如下：94℃预变性 3 min；进行 30 个循环包括 94℃变性 1 min，55℃退火 45 s，72℃延伸 1 min；继续 72℃延伸 7 min，以 ddH_2O 代替模板作空白对照。

1.4　序列测定

PCR 产物主要采用直接测序，将 PCR 粗产物的纯化及测序委托上海生工生物工程技术服务有限公司完成。为了确保测序的准确性，本研究对部分地区样品进行克隆测序，并对广州同一美洲斑潜蝇个体 DNA 插入片段的多个阳性克隆进行了测序。用 Takara pMD18-T Vector 试剂盒完成连接实验，用菌种 DH-5α 制备感受态细胞，根据蓝白斑筛选阳性克隆，用筛选出的阳性克隆菌液抽提质粒，用 *Eco*R Ⅰ 和 *Hin*d Ⅲ 酶切以确定是否含有目的片段。最终将含有目的片段的克隆菌液送上海生工生物技术服务有限公司进行序列测定。

1.5　DNA 序列数据处理

用 Clustal W 程序（Thompson *et al*.，1994）对获得的 ITS1 基因片段序列进行对位排列，用 MEGA3.1（Kumar *et al*.，2004）对上述序列进行碱基含量和多态位点分析，选取基于 Kimura-2-Parameter 双参数模型（Kimura，1980），采用邻近距离法（Neighbourhood Joining，NJ，Sitou and Nei，1987）构建系统进化树来推演系统发生关系。在构建系统树时，用三叶草斑潜蝇 *L*. *trifolii*、番茄斑潜蝇 *L*. *bryoniae* 和南美斑潜蝇 *L*. *huidobrensis* 作为外群比较，同时用 Bootstrap 1 000次检验分子系统树中各分枝的置信度（Felsenstein，1985），DNA 序列变异中的转换和颠换赋予相同的加权值。

2　结果与分析

2.1　不同地理种群美洲斑潜蝇序列分析

测序结果经比较、剪切后得到 301～304 bp 的 rDNA-ITS1 完整序列，共发现 8 个变异位点，占所测序列的 2.64%，有 5 个碱基的替换（包括 2 个转换和 3 个颠换）和 3 个碱基的插入与缺失。序列中 A＋T（85.6%）含量远远高于 G＋C（14.4%）含量，与其他 3 种斑潜蝇种类 rDNA-ITS1 的碱基组成特点基本一致（平均碱基含量 A＋T 为 85.1%，G＋C 为 14.9%）。

供试样品中广东种群是同一个体多个阳性克隆测序，得到的两条序列之间的遗传差异很小，所以只选其中一条序列进行系统进化分析。以番茄斑潜蝇、三叶草斑潜蝇和南美斑潜蝇为外群种，采用软件 MEGA3.1 对美洲斑潜蝇不同地理种群 ITS1 序列之间进行遗传差异分析和聚类。从表 2 可以看出，美洲斑潜蝇不同地理种群之间的 ITS1 序列遗传距离很低，都在 0.02 以下，并且广州种群不同拷贝之间的遗传距离最小，只有 0.004。从图 1 可以看出，美洲斑潜蝇不同地理种群之间亲缘关系很近，首先聚类后再与其他近缘种聚类，并且虽然北京和海南这 2 个种群与其他种群间的亲缘关系与地理分布不相符，但是从整体趋势来看，美洲斑潜蝇各地理种群间的亲缘关系趋向于与其地理分布相一致。

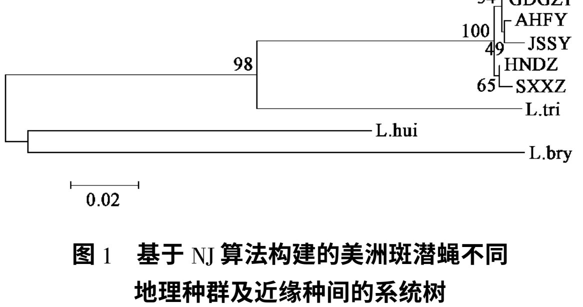

图 1　基于 NJ 算法构建的美洲斑潜蝇不同地理种群及近缘种间的系统树

Fig. 1　NJ tree of geographical populations of *Liriomyza sativae* and closely related species based on rDNA ITS1 sequences by MEGA3.1

表 2 美洲斑潜蝇不同地理种群及近缘种基于 rDNA-ITS1 的遗传距离

Table 2 Diversity based on rDNA-ITS1 among geographical populations of *Liriomyza sativae* and closely related species

	GDGZ2	SXXA	AHFY	JSSY	GDGZ1	GXNN	BJ	GZTR	HNDZ	*L. tri*	*L. hui*	*L. bry*
GDGZ2	–	0.004	0.005	0.007	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.027	0.034	0.048
SXXA	0.004	–	0.007	0.008	0.005	0.005	0.005	0.007	0.004	0.026	0.034	0.048
AHFY	0.008	0.012	–	0.005	0.004	0.004	0.004	0.005	0.006	0.026	0.034	0.048
JSSY	0.012	0.016	0.008	–	0.005	0.005	0.005	0.007	0.007	0.027	0.033	0.048
GDGZ1	0.004	0.008	0.004	0.008	–	0.000	0.000	0.004	0.004	0.026	0.033	0.048
GXNN	0.004	0.008	0.004	0.008	0.000	–	0.000	0.004	0.004	0.026	0.033	0.048
BJ	0.004	0.008	0.004	0.008	0.000	0.000	–	0.004	0.004	0.026	0.033	0.048
GZTR	0.008	0.012	0.008	0.012	0.004	0.004	0.004	–	0.005	0.027	0.034	0.048
HNDZ	0.008	0.004	0.008	0.012	0.004	0.004	0.004	0.008	–	0.026	0.034	0.047
L. tri	0.158	0.153	0.153	0.158	0.153	0.153	0.153	0.158	0.149	–	0.037	0.044
L. hui	0.233	0.238	0.233	0.228	0.228	0.228	0.228	0.233	0.233	0.271	–	0.046
L. bry	0.390	0.384	0.384	0.390	0.384	0.384	0.384	0.390	0.378	0.340	0.366	–

注：选取 Kimura-2-Parameter 双参数模型（Kimura，1980）。对角线以下为遗传距离，对角线以上为标准误。
Notes: Using Kimura-2-Parameter model. Data below diagonal are pairwise distances and above diagnal are standard error.

2.2 近缘种之间的序列分析

美洲斑潜蝇与其近缘种的 ITS1 序列差异非常显著，有 126 个变异位点（不包括开头的 60 个位点），信息位点数较丰富，为 57 个。其中有 13 个位点的碱基只在 3 个近缘种间相同（表 3），而在美洲斑潜蝇相同位点处则不同，并且除了第 311 位点有碱基插入或缺失存在时不稳定外，其他 12 个位点的碱基在美洲斑潜蝇各种群间极为稳定，显然这 12 个位点可以作为美洲斑潜蝇与其近缘种间鉴别的分子标记。

表 3 美洲斑潜蝇地理种群与近缘种间的特异性识别位点

Table 3 Authenticable sites among *Liriomyza sativae* populations and closely related species

种名 Species	特异性识别位点 Authenticable sites												
	68	95	98	101	106	107	125	131	132	133	259	260	311
L. sativae	–	A	T	A	T	T	A	C	T	T	T	T	C
L. trifolii *L. bryoniae* *L. huidobrensis*	T	T	A	T	A	A	T	T	A	A	A	A	A

从表 2 可以看出，美洲斑潜蝇与其近缘种间 ITS1 序列遗传距离明显高于美洲斑潜蝇种群间的遗传距离，为 0.149～0.390，其中番茄斑潜蝇与其他 3 种斑潜蝇之间的遗传距离最高，都在 0.3 以上。从美洲斑潜蝇与近缘种之间的系统发育树可以看出（图 1），美洲斑潜蝇和三叶草斑潜蝇的亲缘关系较近，聚为一簇，而番茄斑潜蝇和南美斑潜蝇的亲缘关系较近，聚为另一簇。

3 讨论

Pashley（1986）通过研究证明，对植食性昆虫来说，异域分布的昆虫产生种下分化是由地理与寄主的双重作用造成的。寄主植物通过自身的物理与化学因素，对植食性昆虫的生物学习性和遗传特性产生重大影响，进而对这类昆虫的种下分化和新种形成具有重要的促进作用，能够导致群体间生殖隔离程度加剧。在本研究中，由于供试材料分别采自不同寄主植物，并且已有相关报道证实了不同寄主植物对美洲斑潜蝇种群参数的影响存在显著差异（庞保平等，2005）。因此，为了减少寄主植物对实验结果的干扰，作者将不同地理种群的美洲斑潜蝇在同一寄主植物四季豆上饲养了 3 代以上。

本研究样品序列的测序主要采用 PCR 产物直接测序法，并且对产物进行双向测序以增加测序结果的准确性。部分样品采用了克隆测序法，并且将广州种群的样品进行多个阳性克隆测序。结果发现广州种群同一个体不同拷贝间 rDNA-ITS1 序列遗传距离非常小，因此，可忽略同一个体不同拷贝之间的差异，选择其中一条序列进行系统进化分析，这种做法在其他昆虫序列分析中已有相关报道（李正西和沈佐锐，2002）。

在美洲斑潜蝇地理种群序列变异分析中，只发现 8 个变异位点，并且序列长度比较保守，只有 2 个种群发生了 1～2 个碱基的插入或缺失，其余均为 303 bp。美洲斑潜蝇不同地理种群之间的 ITS1 序列

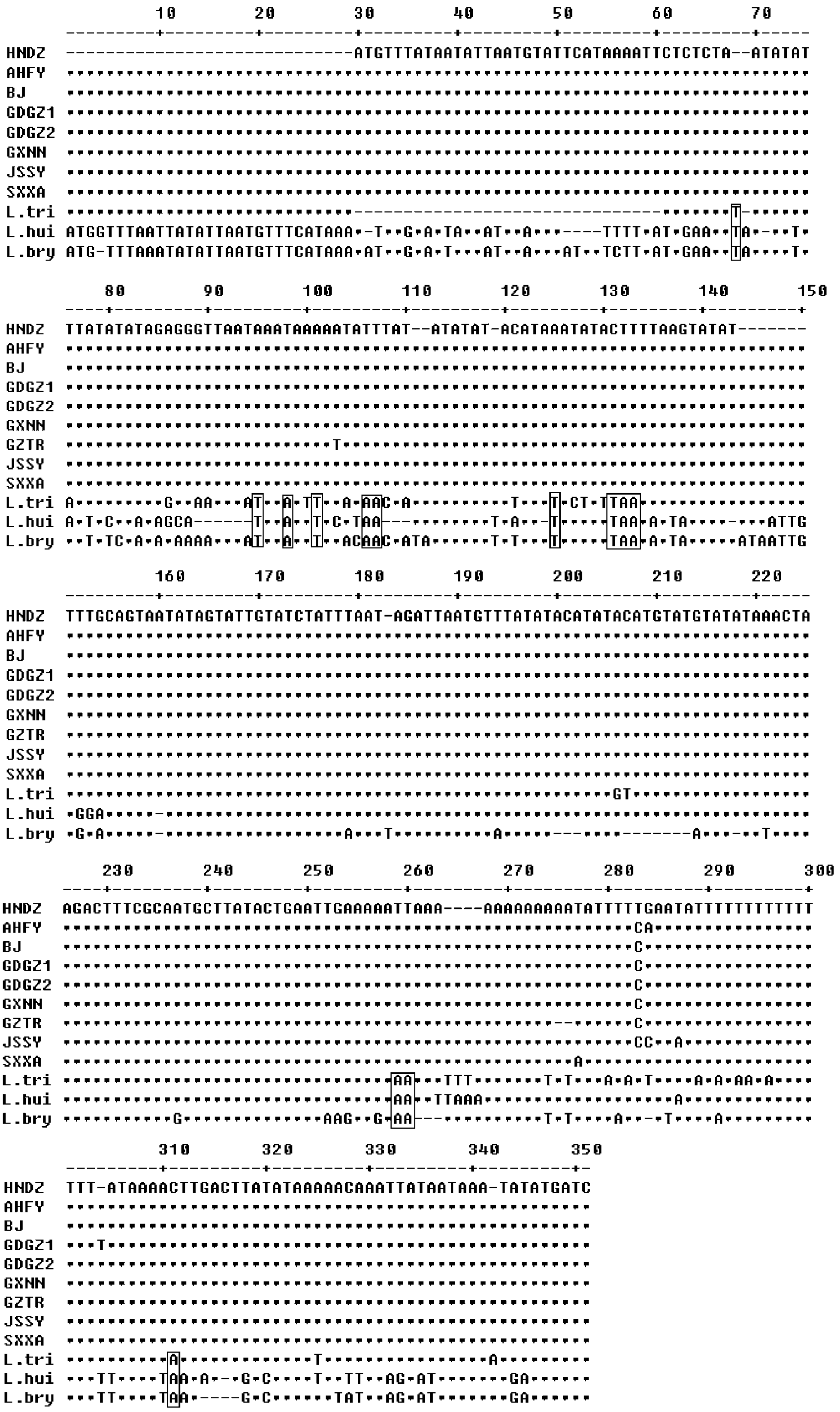

图 2　美洲斑潜蝇不同地理种群及近缘种间 ITS1 序列比对

Fig. 2　Alignments of ITS1 sequences of *Liriomyza sativae* populations and closely related species

遗传距离很低，都在 0.02 以下。从建立的系统发育树来看，虽然北京和海南这 2 个种群与其他种群间

的亲缘关系与地理分布不相符，但是从整体趋势来看，美洲斑潜蝇各地理种群间的亲缘关系趋向于与其地理分布相一致。此外，从实验的结果看，美洲斑潜蝇不同地理种群之间 rDNA-ITS1 序列遗传分化程度很小，但可能在各地区单倍型发生频率上存在着显著差异。但是，美洲斑潜蝇 rDNA-ITS1 序列存在个体内变异，要从单倍型发生频率进行分析，就必须对各样品进行多个阳性克隆的测序。因此，作者认为该基因不适合用于种下遗传分化的分子标记。

从 rDNA-ITS1 分子水平上对美洲斑潜蝇与近缘种间的遗传关系的初步研究表明，美洲斑潜蝇与近缘种间分化程度比较高，遗传距离为 0.149～0.390。从它们的聚类结果来看，美洲斑潜蝇和三叶草斑潜蝇亲缘关系较近，聚为一簇；而番茄斑潜蝇和南美斑潜蝇亲缘关系较近，聚为另一簇。这似乎与它们的形态特征的相似性有所关联。Spencer（1973）认为美洲斑潜蝇及其近缘种的鉴别主要是依据成虫头部双顶鬃着生位置区域的颜色的情况和雄性成虫外生殖器的形态来进行区别的。从顶鬃着生情况来看，三叶草斑潜蝇和番茄斑潜蝇的内外顶鬃都是着生在黄色区，而美洲斑潜蝇与南美斑潜蝇至少有 1 根顶鬃着生在暗色区（张维球和吴佳教，1997），所以三叶草斑潜蝇和番茄斑潜蝇应该首先聚在一起，这与聚类结果不一致。但从雄性成虫外生殖器的形态来看，番茄斑潜蝇和南美斑潜蝇的端阳体都是呈双托状的，而美洲斑潜蝇和三叶草斑潜蝇都是单托状的，只是三叶草斑潜蝇的端阳体中部明显收窄（张维球和吴佳教，1997），所以番茄斑潜蝇和南美斑潜蝇应该首先聚在一起，这与聚类结果是一致的。雄虫外生殖器一直被分类学家认为是最可靠和稳定的分类依据，因此，从这个角度来看，美洲斑潜蝇及其近缘种的形态特征相似性与它们基于 rDNA-ITS1 序列的聚类结果是基本一致的。

美洲斑潜蝇与其近缘种的 ITS1 序列长度上不是非常保守，最多相差了 22 个碱基，但基于 Clustal W 算法对其进行序列比对时非常稳定，同时不同的近缘种之间有较丰富的信息位点。作者认为，当根据形态特征难以鉴别这几个近缘种时，rDNA-ITS1 碱基序列特征是较好的分子鉴别标记，它们之间所存在的较为稳定的 rDNA-ITS1 多样性为从 DNA 分子水平上鉴别美洲斑潜蝇及其近缘种提供了有力证据。同时，在 57 个信息位点中有 12 个特异性识别位点不仅可以作为美洲斑潜蝇与其近缘种间鉴别的分子标记，而且可为今后设计鉴别性 PCR 引物提供重要的参考依据。

参 考 文 献（References）

Chen B，Zhao YX，Kang L，2002. Mechanisms of invasion and adaptation and management strategies of alien leafminers. *Zoological Research*，23（2）：155－160.［陈兵，赵云鲜，康乐，2002. 外来斑潜蝇入侵和适应机理及管理对策. 动物学研究，23（2）：155－160］

Deeming JC，1992. *Liriomyza sativae* Blanchard（Diptera：Agromyzidae）established in the Old World. *Tropical Pest Management*，38（2）：218－219.

Felsenstein，1985. Confidence limits on phylogenies：an approach using the bootstrap. *Evolution*，39：783－791.

Kang L，1996. Ecology and Sustainable Control of Serpentine Leafminer. Beijing：Science Press. 1－125.［康乐，1996. 斑潜蝇的生态学与持续控制. 北京：科学出版社. 1－125］

Kimura M，1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions though comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*，16：111－120.

Kumar SK，Tamura K，Nei M，2004. Mega3：Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*，5（2）：150－163.

Lei ZR，Wang Y，2005. *Liriomyza sativae*. In：Wan FH，Zheng XB，Guo JY eds. Biology and Management of Invasive Alien Species in Agriculture and Forestry. Beijing：Science Press. 177－205.［雷仲仁，王音，2005. 美洲斑潜蝇. 见：万方浩，郑小波，郭建英 主编. 重要农林外来入侵物种的生物学与控制. 北京：科学出版社. 177－205］

Li ZX，Shen ZR，2002. Application of rDNA-ITS2 sequences to the molecular identification of *Trichogramma* spp. *Acta Entomologica Sinica*，45（5）：559－566.［李正西，沈佐锐，2002. 赤眼蜂分子鉴定技术研究. 昆虫学报，45（5）：559－566］

Morgan DJW，Reitzà SR，Atkinson PW，Trumble JT，2000. The resolution of Californian population of *Liriomyza huidobrensis* and *Liromyza trifolii*（Diptera：Agromyzidae）using PCR. *Heredity*，85（1）：53－61.

Pang BP，Cheng JA，Huang EY，Bao ZS，2005. Effects of different host plants on population parameters of *Liriomyza sativae*. *Plant Protection*，31（2）：26－28.［庞保平，程家安，黄恩友，鲍祖胜，2005. 不同寄主植物对美洲斑潜蝇种群参数的影响. 植物保护，31（2）：26－28］

Pashley DP，1986. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm（Lepidoptera：Noctuidae）：a sibling species complex？*Ann. Entomol. Soc. Am.*，79（6）：898－904.

Qiu YZ，Wu WZ，Xiao XF，Shi ZR，2000. Application of RAPD-PCR in the quickly determining of six kinds of leafminers *Liriomyza* spp.（Diptera：Agromyzidae）. *Chin. J. Entomol.*，20（4）：293－309.［邱一中，吴文哲，萧旭峰，石正人，2000. RAPD-PCR 在六种斑潜蝇（*Liriomyza* spp.）（双翅目：潜蝇科）快速鉴定技术之应用. 中华昆虫，20（4）：293－309］

Saitou N，Nei M，1987. The neighbor-joining method：a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*，4：406－425.

Scheffer SJ，2000. Molecular evidence of cryptic species within the *Liriomyza*

huidobrensis (Diptera：Agromyzidae). *J*. *Econ* . *Entomol*., 93(4)：1 146 – 1 151.

Scheffer SJ, Anura W, Diedrich V, Rebecca HH, 2001. Polymerase chain reaction-restriction fragment-length polymorphism method to distinguish *Liriomyza huidobrensis* from *L*. *langei* (Diptera：Agromyzidae) applied to three recent leafminer invasions. *J*. *Econ*. *Entomol*., 94 (5)：1 177 – 1 182.

Scheffer SJ, Lewis ML, 2001. Two nuclear genes confirm mitochondrial evidence of cryptic species within *Liriomyza huidobrensis* (Diptera：Agromyzidae). *Ann*. *Entomol*. *Soc*. *Am*., (5)：648 – 653.

Spencer KA, 1973. Agromyzidae (Diptera) of economic importance. *Series Entomologica*, 9：1 – 418.

Tang BP, Zhou KY, Song DX, 2002. Application of sequences of nrDNA ITS to molecular systematics of invertebrates. *Chinese Journal of Zoology*, 37(4)：67 – 73. [唐伯平,周开亚,宋大祥,2002. 核 rDNA ITS 区序列在无脊椎动物分子系统学中的应用. 动物学杂志, 37(4)：67 – 73]

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W：Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22：4 673 – 4 680.

Wang J, Shi BC, Gong YJ, Liao D, Song J, Lu H, 1999. Plant items of *Liriomyza sativae*. *Beijing Agricultural Sciences*, 17(1)：37 – 39. [王军,石宝才,宫亚军,廖度,宋婧,路虹,1999. 美洲斑潜蝇寄主植物调查名录. 北京农业科学, 17(1)：37 – 39]

Wen SY, He XF, 2003. A method of rapid preparation of trace-DNA templates of insects for PCR. *Entomological Knowledge*, 40(3)：276 – 279. [温硕洋,何晓芳,2003. 一种适用于昆虫痕量 DNA 模板制备的方法. 昆虫知识, 40(3)：276 – 279]

Zhang WQ, Wu JJ, 1977. Identification of four polyphagous leafminers *Liriomyza* spp. *Plant Quarantine*, 11(Suppl.)：51 – 55. [张维球,吴佳教,1997. 四种多食性斑潜蝇的识别. 植物检疫, 11(增刊)：51 – 55]

（责任编辑：袁德成）